







B1

**METHOD OF ASSAYING HUMAN TAU PROTEIN, KIT THEREFOR, AND
DIAGNOSTIC METHOD****Patent number:** WO9418560**Publication date:** 1994-08-18**Inventor:** HOSODA KENJI (JP); EGUCHI HIROSHI (JP);
NAKAMOTO TADAKATSU (JP); KOBAYASHI SHINJI
(JP); KUBOTA TAKAHARU (JP); MORI HIROSHI (JP)**Applicant:** TEIJIN LTD (JP);; HOSODA KENJI (JP);; EGUCHI
HIROSHI (JP);; NAKAMOTO TADAKATSU (JP);;
KOBAYASHI SHINJI (JP);; KUBOTA TAKAHARU (JP);;
MORI HIROSHI (JP)**Classification:****- international:** G01N33/53**- european:** G01N33/68V2**Application number:** WO1994JP00196 19940210**Priority number(s):** JP19930046133 19930212**Also published as:** JP6239899 (A)**Cited documents:** FR2678638
 US5134062
 WO9308302
 WO9311231
 EP0155224
more >>**Report a data error here****Abstract of WO9418560**

A method of immunoassaying a human tau protein present in a human cerebrospinal fluid by using an antibody immobilized on an insoluble support and a labeled antibody, each antibody having a recognition site in the amino acid sequence region ranging from the 251st to the 441st amino acid residues of a human tau protein; and an immunoassay kit therefor. These method and kit enable the concentration of a human tau protein of a normal man and that of a patient with central nerve cytopathy to be determined discriminatively at high sensitivity. Hence the assay results can be utilized for the test, study or diagnosis of patients with central nerve cytopathy.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide**BEST AVAILABLE COPY**

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|--|--|
| (51) 国際特許分類 5 G01N 33/53 | A1 | (11) 国際公開番号 WO 94/18560 (43) 国際公開日 1994年8月18日(18.08.94) |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00196 (22) 国際出願日 1994年2月10日(10. 02. 94) (30) 優先権データ 特願平 5/46133 1993年2月12日(12. 02. 93) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 帝人株式会社(TEIJIN LIMITED)(JP/J) 〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 細田健治(HOSODA, Kenji)(JP/J) 〒193 東京都八王子市千代田4-7-26-306 Tokyo, (JP) 江口広志(EGUCHI, Hiroshi)(JP/J) 〒192-03 東京都八王子市堀之内2169-1-305 Tokyo, (JP) 中本忠克(NAKAMOTO, Tadakatsu)(JP/J) 〒191 東京都日野市多摩平3-18-4-115 Tokyo, (JP) 小林慎治(KOBAYASHI, Shinji)(JP/J) 〒191 東京都日野市多摩平5-20-2-208 Tokyo, (JP) 窪田貴明(KUBOTA, Takaharu)(JP/J) 〒191 東京都日野市平山6-24-18 Tokyo, (JP) 森 啓(MORI, Hiroshi)(JP/J) 〒185 東京都国分寺市東元町2-3-24 Tokyo, (JP)</p> | <p>(74) 代理人 弁理士 大島正孝(OHSHIMA, Masataka) 〒160 東京都新宿区四谷四丁目3番地 福屋ビル 大島特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書</p> | |
| <p>(54) Title: METHOD OF ASSAYING HUMAN TAU PROTEIN, KIT THEREFOR, AND DIAGNOSTIC METHOD</p> <p>(54) 発明の名称 ヒトタウ蛋白の測定方法、そのためのキットおよび診断方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method of immunoassaying a human tau protein present in a human cerebrospinal fluid by using an antibody immobilized on an insoluble support and a labeled antibody, each antibody having a recognition site in the amino acid sequence region ranging from the 251st to the 441st amino acid residues of a human tau protein; and an immunoassay kit therefor. These method and kit enable the concentration of a human tau protein of a normal man and that of a patient with central nerve cytopathy to be determined discriminatively at high sensitivity. Hence the assay results can be utilized for the test, study or diagnosis of patients with central nerve cytopathy.</p> | | |

(57) 要約

本発明はヒト脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法において、該方法は不溶性担体固定化抗体および標識化抗体を使用し且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第251番目～第441番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とする方法およびそのための免疫学的測定キットである。

本発明の方法およびキットは、ヒト脳脊髄液の少ない量を使用し、健常人と中枢神経細胞障害を患っているヒトとのヒトタウ蛋白の濃度を区別して感度よく測定できる。従って、その測定結果は、中枢神経細胞障害を患っている人の検査、研究或いは診断に役立てることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | |
|--------------|------------|----------------|---------------|
| AM アルメニア | CZ チェッコ共和国 | KP 朝鮮民主主義人民共和国 | NZ ニュージーランド |
| AT オーストリア | DE ドイツ | KR 大韓民国 | PL ポーランド |
| AU オーストラリア | DK デンマーク | KZ カザフスタン | PT ポルトガル |
| BB バルバドス | EE エストニア | LJ リヒテンシュタイン | RO ルーマニア |
| BE ベルギー | ES スペイン | LK スリランカ | RU ロシア連邦 |
| BF ブルキナ・ファソ | FI フィンランド | LT リトアニア | SD スーダン |
| BG ブルガリア | FR フランス | LU ルクセンブルグ | SE スウェーデン |
| BJ ベナン | GA ガボン | LV ラトヴィア | SI スロヴェニア |
| BR ブラジル | GB イギリス | MC モナコ | SK スロヴァキア共和国 |
| BY ベラルーシ | GE グルジア | MD モルドバ | SN セネガル |
| CA カナダ | GN ギニア | MG マダガスカル | TD チャード |
| CF 中央アフリカ共和国 | GR ギリシャ | ML マリ | TG トーゴ |
| CG コンゴ | HU ハンガリー | MN モンゴル | TJ タジキスタン |
| CH スイス | IE アイルランド | MR モーリタニア | TT トリニダードトバゴ |
| CI コート・ジボアール | IT イタリア | MW マラウイ | UA ウクライナ |
| CM コメルーン | JP 日本 | NE ニジェール | US 米国 |
| CN 中国 | KE ケニア | NL オランダ | UZ ウズベキスタン共和国 |
| CS チェコスロヴァキア | KG キルギスタン | NO ノルウェー | VN ヴィエトナム |

- 1 -

明 細 書

ヒトタウ蛋白の測定方法、そのためのキットおよび診断方法

〔産業上の利用分野〕

- 5 本発明はヒト脳脊髄液中のタウ蛋白の測定方法、そのためのキットおよびそれに関連する利用に関するものである。さらに詳しくはヒト脳脊髄液中のタウ蛋白を、中枢神経細胞障害を患っている人とそうでない健常人とを区別して正確に測定しうる免疫学的方法、そのためのキットおよびそれに関連する利用に関するものである。

10

〔従来技術〕

- タウ蛋白は、神経原繊維（P H F : paired helical filament）の構成成分であり、その神経原繊維の変化は神経細胞を死に導くので、アルツハイマー病の診断に有用である可能性が知られているが、その測定は、主に免疫組織学的に剖検サンプルで検討されてきた。しかし、アルツハイマー病の診断マーカーとするには、生体内の体液中の存在量を知ることが効果的である。またその測定のためには抗体を用いることが考えられる。

- 20 タウ蛋白の測定に抗体を用いる方法として、例えば、脳脊髄液を硫酸により処理し、粗生成した分画中のタウ蛋白を抗体を用いてウェスタンブロッティングしてその存在を確認する方法が提案されている [Peter Davis et al., Annals of Neurology Vol.22,(4),P.521(1987)]。しかし、この提案において用いられている抗体（A 1 z - 5 0）は、磷酸化された異常なタウ蛋白（A - 6 8）を含むアルツハイマー病患者の脳ホモジネート粗画分を免疫原として得られた抗体であり、またこれを用いる検出法はウェスタンブロッティングを用いる複雑な方法である。

- 25 また、C. R. Harrington らは、J. Immunol. Methods ,134(1990) p.261~271において、タウ蛋白に対する2種の抗体を得たことを報

告している。しかし、かれらの採取した２種の抗体（m A b 4 2 3、
7 / 5 1）のうち、前者は通常のタウ蛋白を認識せず、後者はギ酸
で抽出したタウ蛋白のみを認識し、両者とも生体内の体液中に存在
する、天然型のタウ蛋白を認識しないものであり、その測定には用
5 いることができない。

米国特許第 5, 1 3 4, 0 6 2 号明細書には、ヒトから生きた繊維
芽細胞を取り出し、その細胞を培地中で培養し、その細胞からのアル
ルツハイマー病の代謝産物の指標物質を免疫学的に検出することによ
るアルツハイマー病を鑑別（screening）する方法が記載されてい
10 る。この米国特許には、繊維芽細胞として皮膚細胞が示され、アル
ツハイマー病の代謝産物の指標物質として P H F（paired helical
filament）およびタウ蛋白が示されている。この方法は皮膚細胞を
取り出し、培養する必要がある、指標物質の所定量を得るまでに煩
雑な手段と長い時間を必要とする。その上前記米国特許には、P H
15 F 又はタウ蛋白がどの程度の量検出されたのか示す具体例は全く記
載されていない。

さらにカナダ特許第 1, 3 0 2, 2 5 0 号明細書には、脳脊髄液中
の P H F または異常リン酸化タウ蛋白を測定しアルツハイマー病の
治療に役立てる方法が記載されている。この方法は P H F と反応す
20 るモノクローナル抗体が使用される。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明の第 1 の目的は、生体からの体液、特に脳脊髄液中に存在
する可溶性のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法およびそのた
25 めのキットを提供することにある。

本発明の第 2 の目的は、脳脊髄液中の可溶性のヒトタウ蛋白を早
期に且つ簡単に測定しうる方法およびそのためのキットを提供する
ことにある。

本発明の第 3 の目的は、中枢神経細胞障害を患っている人の脳脊

髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を、健常人のそれと区別して、正確に測定しうる免疫学的方法およびそのためのキットを提供することにある。

- 5 本発明の他の目的は、脳脊髄液の少ない量を使用してその中の可溶性ヒトタウ蛋白を正確に測定しうる免疫学的方法を提供することにある。

[課題を解決するための手段]

- 10 本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的は、ヒト脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法において、該方法は不溶性担体固定化抗体および標識化抗体を使用し且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第251番目～第441番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とする方法によって達成されることが見出された。

- 15 さらに本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的は、
(a-1) 不溶性担体に固定化されたヒトタウ蛋白に対する抗体、
(a-2) 標識物質により標識化したヒトタウ蛋白に対する抗体、
(b) 溶解剤
(c) 洗浄剤および
20 (d) 標識物質が酵素である場合には、酵素活性を測定するための基質および反応停止剤

- を組合せたヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の免疫学的測定キットであって、前記(a-1)および(a-2)の抗体は、いずれもヒトタウ蛋白の第251番目～第441番目のアミノ酸配列領域
25 に認識部位を有していることを特徴とするキットによって達成されることが見出された。

- さらに本発明者らの研究によれば、前記本発明の目的は
(i) ヒトからヒト脳脊髄液を準備し、
(ii) 不溶性担体固定化抗体および標識化担体であり且ついずれの

抗体もヒトタウ蛋白の第 2 5 1 番目～第 4 4 1 番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有している抗体を準備し、

(iii) 前記(i)のヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を前記(ii)の 2 種の抗体を使用して免疫学的に測定し、

5 (iv) その測定した値より、ヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の量を決定し、そして

(v) その量よりそのヒトの中枢神経細胞障害の病症を診断する、ことを特徴とするヒトの中枢神経細胞障害の病症の診断方法によって達成されることが見出された。

10 前記本発明の測定方法およびそのためのキットは、固定化抗体および標識化抗体のいずれの抗体も、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列において第 2 5 1 番目 (Pro.) から第 4 4 1 番目 (Leu.) までの領域に認識部位を有する抗体を使用する点に特徴を有している。このような抗体の組合せによって、脳脊髄液を何等の処理を要することなく、そのまでその中に含有される可溶性のヒトタウ蛋白を高い感度
15 で測定でき、その測定結果は、中枢神経細胞障害を患っている人と健常人とでは明らかに異なっている。すなわち本発明の免疫学的測定方法に従えば中枢神経細胞障害を患っている人からの脳脊髄液中のヒトタウ蛋白の量は、健常人のそれよりも明確に高い濃度で検出
20 される。

従って本発明の測定結果は中枢神経細胞に障害を有する人或いはその疑いを有する人の臨床、或いは病理的観点からの検査、研究または診断に役立てることができる。

中枢神経細胞障害とは、中枢神経細胞に何らかの障害によって引き起される病気または症状であり、例えば脳血管障害、アルツハイマー病および一酸化炭素中毒などによって起る病気或いは病症を云
25 う。特に本発明はアルツハイマー病またはその疑いのある人の検査、研究または診断に利用されることが期待できる。前記した中枢神経細胞の障害に基づく病症は、いずれも脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ

蛋白の濃度が健常人のそれと比べて高い値を示す。

本発明において、固定化抗体および標識化抗体の2つの抗体が、いずれもヒトタウ蛋白の441個のアミノ酸配列において、第251番目から第441番目の領域である中間部からC末端のアミノ酸
5 配列領域に認識部位を有するものであり、それによって何故高感度で可溶性のヒトタウ蛋白が測定できるかはわからない。

本発明者らは、ヒトタウ蛋白を特異的に認識するいくつかのモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作成し、それらを使用して脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の免疫学的測定を試みた。例
10 えば、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の前記中間部よりもN末端側の領域に認識部位を有するいくつかのモノクローナル抗体を得た。そのいくつかのモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組合せて免疫学的測定を行った。このような抗体の組合せでは検量線を作成することは出来たが、実際に脳脊髄液を検査試料として測定すると
15 感度が不十分で安定した測定結果を得ることができず、検査、研究或いは診断に利用できるものは見出せなかった。

しかし本発明のように、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の前記中間部よりもC末端側に認識部位を有する抗体を固定化抗体および標識化抗体の両抗体共、使用する場合には、安定して且つ高感度に可溶
20 性ヒトタウ蛋白を測定できた。

本発明で使用される抗体は、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の第251番目～第441番目の領域にその認識部位を有する限り、モノクローナル抗体であっても或いはポリクローナル抗体であってもよい。またその組合はいずれでよいが、固定化抗体および標識化抗体
25 共にポリクローナル抗体の使用が好ましい。

本発明の抗体は、前記したようにポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体の場合には、アジュバンドとしてFreund Complete Adjuvantまたは、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ (アラム) などを用い、精製したヒトタウ蛋白を公知の方

法で動物に免疫することにより、その抗血清として得ることができる。

一方、モノクローナル抗体の場合には、ケラーとミルシュタインによる細胞融合法 [G. Koeller and Milstein, Nature (Lond), 256, 495-497 (1975)] により作成されたハイブリドーマを培養し、その培養液からヒトタウ蛋白と反応する抗体を分離することにより調製される。細胞融合に用いられる細胞としては P 3 U 1 などを挙げることができる。

抗体の作成にあたり、免疫原として用いるヒトタウ蛋白としては、ヒトの脳から精製された、pH 6.5 ~ 8.5 (中性) の T r i s s a l i n e に溶解するものが好ましい。このようにして得られたヒトタウ蛋白を免疫して得られる抗体のうち、ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の [251-441] の蛋白を認識するものを選び出して使用する。

本発明の抗体を用いて、免疫学的測定法により、脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を修飾することなくそのまま、特異的かつ感度よく測定することができる。免疫学的定量法としては、酵素免疫測定法 (E I A)、放射免疫定量法 (R I A)、蛍光免疫定量法などを挙げることができる。E I A としては、例えば「酸素免疫測定法」(第2版、石川栄治他著、医学書院1982)などに記載されているそれ自体公知の方法を用いることができる。E I A としては、サンドイッチ法および競合法と称される方法のいずれでもよい。

サンドイッチ法による E I A においては、本発明のヒトタウ蛋白に対する抗体を用い、例えば次のような手順に従い定量する。すなわち、2つの抗体のうちの一方の抗体(第1抗体)を適当な不溶性担体(例えばプラスチック容器)に固定化する(以下これを“固定化抗体”という)。次いで不溶性担体と測定しようとする試薬または検体試料との非特異的結合を避けるために適当な物質(例えば牛血清アルブミン)で不溶性担体の表面を被覆する。このようにして

- 得られた第1抗体が固定化された不溶性担体を検体試料と一定時間および温度で接触させ反応させる。この間に固定化抗体（第1抗体）と検体試料中のヒトタウ蛋白が結合する。次いで不溶性担体を適当な洗浄液で洗った後、適当な標識物質（例えば酵素）で標識したヒ
- 5 トタウ蛋白に対する他方の抗体（第2抗体）の溶液（例えば水溶液）と一定時間および温度で接触させ、固定化抗体に結合したヒトタウ蛋白と第2抗体を反応させる。これを適当な洗浄液で洗い、次いで不溶性担体上の固定化抗体とタウ蛋白を介して結合して存在する第2抗体に標識された標識物質の量を測定する。
- 10 なお上記サンドイッチ法は、固定化抗体、標識化抗体およびタウ蛋白を含有する検体試料を同時に混合し、一定時間および温度でこれら三者を同時に接触させ反応させて行うこともできる。
- かくしてその値から検査試料中のタウ蛋白の量を算出することができる。通常、サンドイッチ法では、第1抗体と第2抗体とが双方
- 15 ともモノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよいし、また一方をモノクローナル抗体とし、他方をポリクローナル抗体として用いることもできる。しかし前述したように第1抗体および第2抗体が共にポリクローナル抗体であるのが感度の点で好ましい。
- 20 競合法としては、例えば担体に固定した抗原と測定すべき抗原とに対し、一定量の標識化抗体を競争的に反応させて担体固定化抗原・標識化抗体複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、担体に結合した標識化抗体の標識物質の量を測定する方法や、担体に抗体を固定し、
- 25 標識化抗原と測定すべき抗原とを競争的に反応させて担体固定化抗体・標識化抗原複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、担体に結合した標識化抗原の標識物質の量を測定する方法を挙げることができる。
- 前記サンドイッチ法および競合法のそれぞれにおいて、抗体は完全抗体であってもよく、また抗体をペプシンで消化して得られたF（a b'）₂、F（a b'）₂を還元して得られたF a b'または抗体を

パパイんで消化して得られたF a bなどの、抗原に結合しうる抗体フラグメントを抗体として、また、これらを標識して標識抗体として使用することができる。

本発明のヒトタウ蛋白の測定方法において使用される不溶性担体
5 としては、通常免疫学的測定に使用されるものであればよく、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、弗素樹脂、架橋デキストラン、アガロース、ポリサッカライドなどの高分子の他、紙、ガラス、金属およびこれらの組合せなどを例示することができる。不溶性担体の形状は、例
10 えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管などの種々の形状であることができる。

また、標識化抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質および放射性物質等を使用することができる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシ
15 ダーゼなどを、蛍光物質としてはフルオレッセインイソチオシアネート、フィコビリプロテインなどを、発光物質としてはイソルシノール、ルシゲニンなどを、そして放射性物質としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H などを使用することができるが、これらは例示したものに限らず、免疫学的測定法に使用し得るものであれば、他のものでも
20 よい。

標識剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質および必要により発色剤が用いられる。これらの例としては、例えば、酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素を用い、発色剤として2,2'-アジノジー(3-エチルベンズ
25 チアゾリンスルホン酸)アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリンまたは3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンなどを、酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、基質としてo-ニトロフェニルフォスフェートなどを、酵素として β -D-ガラクトシダ

ーゼを用いる場合には基質としてフルオレセインージ（ β -D-ガラクトピラノシド）または4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドなどを組み合わせて用いられる。

本発明の測定キットにおいて（b）溶解剤としては、免疫学的測定に通常使用されるものであればよく、例えばリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液などを含んだpHが6.0～8.0の範囲のものが好適な例として示される。さらに（c）洗浄剤としては、同様に免疫学的測定に一般的に使用されているものがそのまま使用される。その例としては、生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液及びこれらの混合液が挙げられる。これら洗浄剤にはさらにトリトンX100、Tween 20またはBrig 35の如き非イオン系界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウムの如きイオン系界面活性剤を加えられていてもよい。

15 [実施例]

以下、実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1（抗ヒトタウ蛋白抗体の取得）

20 （1）ヒトタウ蛋白の精製

凍結したヒト脳を4倍容のTS Buffer（20mMトリス、150mM NaCl；pH7.6）に溶解した。溶解液を遠心（10K r.p.m×50分間）し、上清を硫酸を用いて分画した（33～50%硫酸）。得られた沈澱をTBS Buffer（50mMトリス、500mM NaCl；pH7.6；脳重量の1/6容）に溶解し、均一にホモジナイズして、10分間煮沸処理を行った。次いで遠心（10K r.p.m×10分間）し、上清をSephadex G-25を用いて分画した（平衡液0.1M MES；pH6.5）。次いでホスホセルロースを用いて食塩濃度の変化により溶出させ、再度飽和硫酸を使用して濃

縮した。得られた沈澱を T S Buffer 1 mℓ に懸濁し、溶解させて、ミリポアフィルター H V (0.45 μm) にて濾過して次いで H P L C をかけた (カラム; J. T. Bakerbond C4 4.6 × 250 m/m)。溶出した 2 番目のピークを採取した。これが精製ヒトタウ蛋白である。

(2) ヒトタウ蛋白に対する抗体の作成

前記 (1) にて精製したヒトタウ蛋白を、Freund の complete adjuvant とまぜ W/O/W エマルジョンを作成した。家兎を 3 回、2 月おきに免疫を行った。3 回免疫後、7 日後に全採血を行った。次いで 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したプロテイン A セファロースカラムに抗血清を流し、洗浄後 pH 3.0 の 0.1 M クエン酸 Na を流し、カラムから抗ヒトタウ蛋白抗体 (IgG) を溶出し、精製抗体 (IgG) を得た。

実施例 2 (抗ヒトタウ蛋白抗体の認識部位の決定)

ヒトとウシのタウ蛋白は、高度に類似した一次構造を有し、検疫反応上の交叉反応性も認められることが知られている。そこで、大量調製の容易なウシタウ蛋白を用いて、以下のように、実施例 1 で得られた抗ヒトタウ蛋白抗体の認識部位を決定した。

すなわち、ウシタウ蛋白をギ酸の存在下、C N B r (Baker bond C4、カラム) により切断した。この反応物を逆相 H P L C を用いて分離して (40 分にてアセトニトリル 0 → 80% の gradient、流速 1 mℓ/分)、80 のフラクションを得た。図 1 に逆相 H P L C のパターンを示す。

得られた各フラクション (1 ~ 80) の一部をポリスチレン製のマイクロプレートに加え、風乾させて固定した。風乾後、1% B S A - P B S でアフターコートし、実施例 1 で得られた精製抗体 (IgG) を希釈して加え、1 時間反応させた。次いで、ここに、抗ウサギ IgG 抗体の F (a b')₂ - H R P 標識を加え、1 時間反応後、

発色基質 (A B T S) を加え、実施例 1 で得られた精製抗体 (I g G) がどのフラクションと反応するか調べた。

その結果、フラクション N o . 3 4 と N o . 4 4 に高い反応性が示された。すなわち、これらのフラクションに含まれているペプチド
5 が、実施例 1 において得られた抗ヒトタウ蛋白抗体と特異的に結合することが明らかとなった。フラクション N o . 3 4 ピークの N 末端は、P r o - A s p - L e u - L y s であり、N o . 4 4 ピークの N 末端も P r o - A s p - L e u - L y s であることが判明した。

ウシタウ蛋白のアミノ酸配列 (Himmler et al., MOLECULAR AND C
10 ELLULAR BIOLOGY, Apr. 1989, p. 1381-1388) より、C N B r によりメチオニン (M e t) の C 末端が切断されることを考慮すると、N o . 3 4 ピークは [2 5 8 - C 末]、N o . 4 4 ピークは [2 5 8 - 4 2 6] と推定される。対応するヒトの蛋白のアミノ酸配列 (配列表参照 Goedert et al., 1989, Neuron, 3, 519-526) は、[2 5 1 - 4
15 4 1] と言える。従って、本抗体の認識するヒトタウ蛋白のエピトープは、そのアミノ酸配列の [2 5 1 - 4 4 1] といえることができる。

実施例 3 (抗ヒトタウ蛋白抗体を用いたサンドイッチ法 E I A
20 によるヒトタウ蛋白の測定)

(1) 抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ (直径 6 m m) をよく洗浄してから、実施例 1 で得た抗体の $20 \mu\text{g}/\text{m l}$ の濃度を有する P B S 溶液中に 4°C の温度で 1 昼夜放置した後、P B S で洗浄し、1 % 牛血清アルブ
25 ミン (B S A) の P B S 溶液中に、 4°C の温度で 1 昼夜放置してポストコーティング処理して、抗ヒトタウ蛋白抗体固定化ビーズを得た。

(2) H R P 標識化抗体の調製

実施例 1 で採取した抗ヒトタウ蛋白抗体の $2.0 \text{ m g}/\text{m l}$ の P B

S 溶液 1 ml に、1 M の酢酸緩衝液 (pH 4.2) 100 μ l と、4
0 μ g のペプシンを 20 μ l の同緩衝液に溶解して加え、37 $^{\circ}$ C、
4 時間反応させた。反応終了後、PBS にて平衡化したセファデッ
クス G 25 カラム (ϕ 2 cm \times 45 cm) を用いて分離し、F (a
5 b')₂ を採取した。F (a b')₂ の 1 mg/ml 0.01 M リン酸
0.15 M NaCl (pH 7.4) 溶液 2 ml に、MBS 10 mg
/ml の濃度のジメチルホルムアミド溶液 50 μ l を添加し、25
 $^{\circ}$ C の温度で 30 分間反応させた。次いでセファデックス G-25 を
10 充填したカラムを用い、0.1 M リン酸緩衝液 (0.1 M PB) (pH 6.0) でゲル濾過を行い、マレイミド化抗体と未反応 MBS とを
分離した。

一方、HRP の 10 mg/ml の 0.1 M PB (pH 6.5) 溶液
2 ml に S-アセチルメルカプト無水コハク酸の 60 mg/ml ジ
メチルホルムアミド溶液 120 μ l を加え、25 $^{\circ}$ C で 2 時間反応さ
15 せた。次に 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) を 800 μ l、
0.1 M EDTA 160 μ l、1 M ヒドロキシルアミン 1.6 ml
を加え、37 $^{\circ}$ C で 4 分間反応させた。その後、反応液をコロジオン
バッグに入れ、0.1 M PB (pH 6.0)、5 mM EDTA 含有
溶液を用いて、4 $^{\circ}$ C で 3 日間透析し、チオール化 HRP を得た。

20 次に、マレイミド化抗体 2 mg とチオール化 HRP 4 mg とを混
合し、コロジオンバッグを用いて氷冷下に 4~10 mg/ml の蛋
白濃度になるまで濃縮し、15~20 $^{\circ}$ C で一夜放置した。その液を、
ウルトロゲル AcA 44 (LKB 社) を充填したカラムでゲル濾過
し、HRP 標識化抗ヒトタウ蛋白抗体を得た。

25 (3) サンドイッチ EIA 測定系

(1) で調製した抗タウ蛋白抗体固定化ビーズ 1 個と、精製した
ヒトタウ蛋白 (標準物質) を 0~20 ng/ml の範囲で含有する
1% BSA 含有 0.05 M TBS (pH 8.0) 200 μ l と、(2)
で作成した HRP 標識ヒトタウ蛋白抗体の 1% BSA 含有 0.05 M

TBS (pH 8.0) 溶液 200 μ l とを、各試験管に添加して、25℃の温度で2時間インキュベートした。次に試験管内の溶液を吸引除去した後、0.05 M TBS (pH 8.0) で洗浄してから、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩 0.02% 及び H₂O₂ 2.5 mM を含有する 0.1 M リン酸/クエン酸緩衝液 (pH 4.3) を 0.4 ml ずつ各試験管に加え、25℃の温度で30分間反応させた後、反応停止剤として 1 N 硫酸水溶液を 1 ml ずつ加えて酵素反応を停止させた。

次いで、分光光度計を用いてこの溶液の 450 nm の波長における吸収強度を測定した。これを標準物質濃度 0 ~ 20 ng/ml に対応してプロットして検量線を得た。この検量線を図 2 に示す。図 2 より、本発明の測定方法を用いれば、0.05 ng/ml まで精度よく測定可能であることがわかる。

15 実施例 4 (患者脳脊髄液中のタウ蛋白の測定)

実施例 3 の手法および実施例 3 で得た検量線を用いて、アルツハイマー病患者 9 名の脳脊髄液中のタウ蛋白の濃度を測定した。コントロールとして健常人 14 名の脳脊髄液を測定した。結果を図 3 に示す。図 3 のとおり、アルツハイマー病患者脳脊髄液中のタウ蛋白
20 レベルの有意の高値が見られる。(P < 0.001)

この図 3 より 0.5 ng/ml 以上のヒトタウ蛋白濃度の場合アルツハイマー病と診断しうる可能性を有している。

25 実施例 5 (脳血管障害および一酸化炭素中毒の患者のタウ蛋白の測定)

実施例 3 の手法および実施例 3 で得た検量線を用いて脳血管障害患者および一酸化炭素中毒患者の脳脊髄液中のタウ蛋白の濃度を測定した。その結果を図 4 に示した。一酸化炭素中毒患者は神経細胞が破壊されることが知られており、その患者の脳脊髄液中のタウ蛋

白の濃度の上昇は、神経細胞の破壊の結果を示しているものと考えられる。このことから推論すると、脳血管障害患者もその神経細胞の破壊が一部出現したものと考えられる。

5 参考例 1 (ヒトタウ蛋白に対するモノクローナル抗体の作成と認識部位の決定)

ケラーとミルスタイン (Koeller & Milstein) の方法に従って、ヒトタウ蛋白に対するモノクローナル抗体を作成した。すなわち、ヒトタウ蛋白を 50 ng/head、フロイント complete adjuvant
10 と混合し、マウスに免疫した。4 回免疫後、3 日後に fusion を行った。ハイブリドーマの出現を確認した後、固相タウ蛋白 (2 μ g/ml にて固定) を用いて抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。

その結果、固相タウ蛋白に反応性が positive な 8 クローンを得
15 た。これら確立した 8 クローンの認識部位を決定するため、これら 8 クローンの上清を用いて、ヒトタウ蛋白とウシタウ蛋白との反応性の違いを検討した。その結果、これら 8 クローンは全てヒトタウ蛋白のみに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するクロンであった。このことを検討するため、ヒトタウ蛋白とウシタウ蛋白の一次構造を比較した。ヒトタウ蛋白とウシタウ蛋白とは、ヒト
20 タウ蛋白の 1 番目から 248 番目のアミノ酸配列領域において異なる部分が存在し、他の領域は全く同じ一次構造を有していることがわかった。このことから、前記 8 クローンが産生する抗体の認識部位は、全て 1 番目から 248 番目の領域に存在することは明らかで
25 ある。

参考例 2 (モノクローナル抗体および実施例 1 で得られたポリクローナル抗体を使用した EIA 測定系)

参考例 1 において確立した 8 クローンを培養し、上清からモノク

ローナル抗体を精製した。8種のモノクローナル抗体の全てを、それぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液とし、各々の溶液にポリスチレンボールを浸漬し、モノクローナル抗体を固定化した。各々の固定化モノクローナル抗体と実施例3のHRP標識抗ヒトタウ蛋白抗体とを用いたサンドイッチ測定系を構築した。前記8種のモノクローナル抗体のうち2種のみが良好な検量線を得ることができた。この2種のモノクローナル抗体とHRP標識抗ヒトタウ蛋白抗体とのサンドイッチ測定系をMCA (F-F₁₁) - PCAおよびMCA (F-H₅H) - PCAと略称する。一方、実施例1で得られたポリクローナル抗体を同様に固定化し、HRP標識抗ヒトタウ蛋白抗体と組合せて作成したサンドイッチ測定系を“PCA - PCA”と略称する。前記3つのサンドイッチ測定系を使用して得られた検量線を図5に示した。図5から明らかなようにMCA (F-F₁₁) - PCA、MCA (F-H₅) - PCAおよびPCA - PCAのいずれも同様の検量線を作成することができた。

実施例6 (脳脊髄液中のヒトタウ蛋白の測定)

参考例2で得られた3つの測定系を用いて、サンドイッチ法により健常人およびアルツハイマー病患者の脳脊髄液中のヒトタウ蛋白の濃度を測定した。その結果を図6にまとめて示す。

図6中のA、BおよびCはそれぞれ下記測定系の結果を示す。

A : PCA - PCA

B : MCA (F-F₁₁) - PCA

C : MCA (F-H₅) - PCA

図6から明らかなように、A (PCA - PCA) の場合は健常人 (Normal) とアルツハイマー病患者 (AD) とは、ヒトタウ蛋白の量において良好に区別されたのに対して、モノクローナル抗体を用いたBおよびCの場合はいずれも区別は不十分であった。すなわち、Bの場合は健常人のヒトタウ蛋白濃度が0 (ゼロ) である例が5例

中 2 例存在し、健常人と区別できないアルツハイマー病患者の濃度が 1 例（6 例中）存在した。また C の場合、ヒトタウ蛋白濃度が健常人の 4 例において 0（ゼロ）を示し、このこと自体測定法に問題があると云うことができる。

- 5 この図 6 から明らかなようにヒトタウ蛋白のアミノ酸配列の第 251 番目～第 441 番目の領域に認識部位を有する 2 つのポリクローナル抗体を使用した測定系（A）が臨床意義を有する優れた測定系であることがわかる。

10 [配列表]（ヒトタウ蛋白のアミノ酸配列）

配列の長さ：441

配列の型：アミノ酸

配列の種類：蛋白

配列

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Met | Ala | Glu | Pro | Arg | Gln | Glu | Phe | Glu | Val | Met | Glu | Asp | His | Ala | Gly | | | | |
| 1 | | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | | | |
| Thr | Tyr | Gly | Leu | Gly | Asp | Arg | Lys | Asp | Gln | Gly | Gly | Tyr | Thr | Met | His | | | | |
| | | | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | | | | |
| Gln | Asp | Gln | Glu | Gly | Asp | Thr | Asp | Ala | Gly | Leu | Lys | Glu | Ser | Pro | Leu | | | | |
| | | | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | | |
| Gln | Thr | Pro | Thr | Glu | Asp | Gly | Ser | Glu | Glu | Pro | Gly | Ser | Glu | Thr | Ser | | | | |
| | | | | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | | |
| Asp | Ala | Lys | Ser | Thr | Pro | Thr | Ala | Glu | Asp | Val | Thr | Ala | Pro | Leu | Val | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | | 80 | | | | |
| Asp | Glu | Gly | Ala | Pro | Gly | Lys | Gln | Ala | Ala | Ala | Gln | Pro | His | Thr | Glu | | | | |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | | | | |

- 17 -

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

[図面の簡単に説明]

図 1 は、ウシタウ蛋白の CNBr 分解物の HPLC パターンである。

- 5 図 2 は、実施例 3 (3) サンドイッチ EIA 測定系において得られた検量線である。

図 3 は、実施例 4 において行った、アルツハイマー病患者および健常人の脳脊髄液中のタウ蛋白濃度の測定結果を示す。

図 4 は、実施例 5 において脳血管障害および一酸化炭素中毒の患者の脳脊髄液中のタウ蛋白を測定した結果を示す。

図 5 は、参考例 2 において 3 種のサンドイッチ測定系を使用して得られたそれぞれの検量線を示すものである。

- 5 図 6 は、実施例 6 において、3 種のサンドイッチ測定系を使用して得られた健常人とアルツハイマー病患者の脳脊髄液中のタウ蛋白の測定結果を示すものである。

[発明の効果]

- 10 本発明によれば、脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を簡便に且つ高感度で測定できる。その測定は、取り出されたヒト脳脊髄液を、何等の処理することなくそのまま実施することができ、中枢神経細胞の障害を有する人と健常人とは明確に異った値として測定される。しかも検査試料としての脳脊髄液は僅かな量で充分である。かくし
- 15 て本発明は、中枢神経細胞の障害を有する患者の検査、研究或いは診断に効果的に利用しうる。

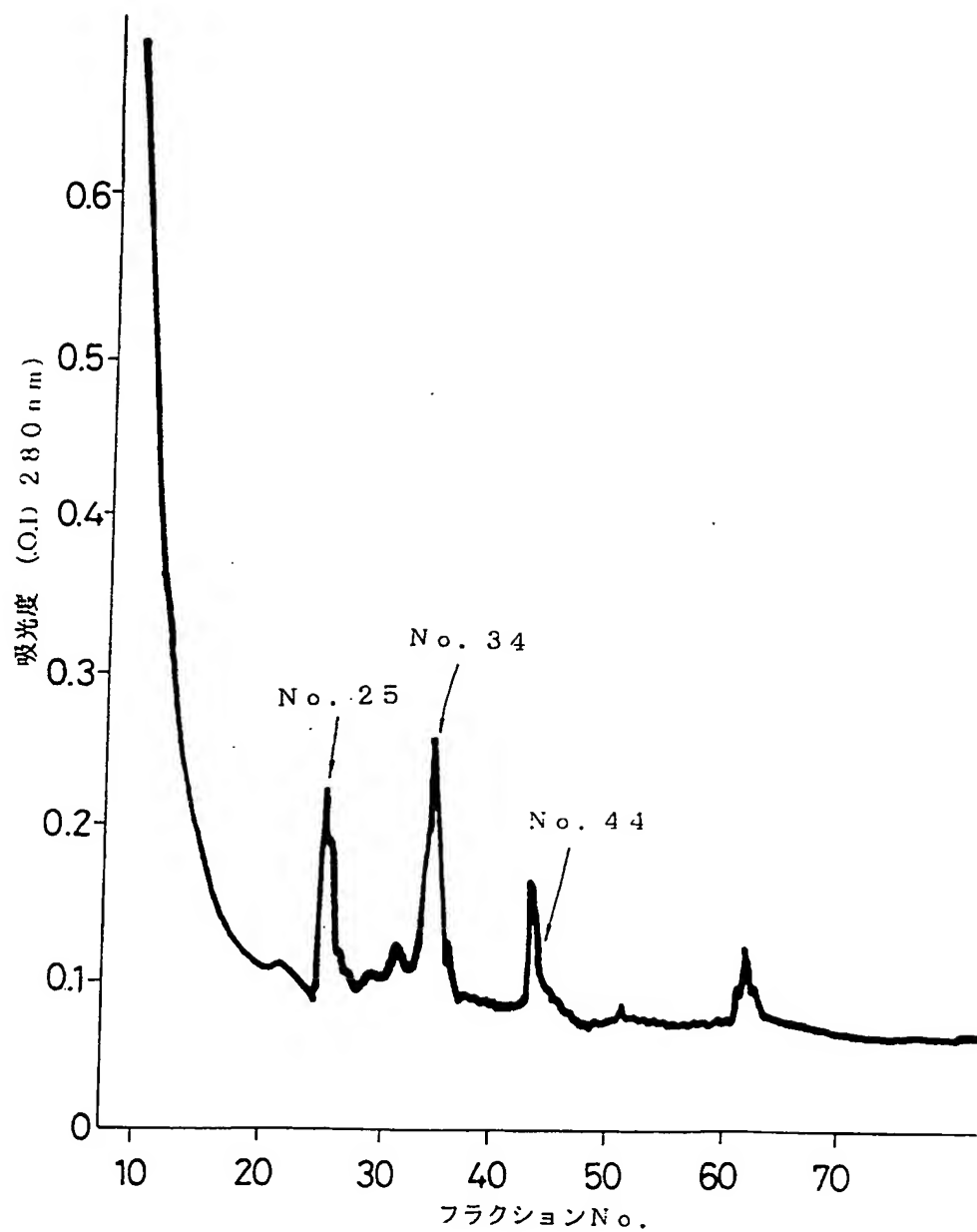
請 求 の 範 囲

1. ヒト脳脊髄液中のヒトタウ蛋白を免疫学的に測定する方法において、該方法は不溶性担体固定化抗体および標識化抗体を使用
5 し且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第251番目～第441番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とする方法。
2. ヒト脳脊髄液中の測定すべきヒトタウ蛋白は可溶性の蛋白であるクレーム1記載の方法。
- 10 3. 該不溶性担体固定化抗体および標識化抗体は、いずれもポリクロナール抗体であるクレーム1記載の方法。
4. 該ポリクロナール抗体は、ヒトの脳から分離された可溶性ヒトタウ蛋白を免疫源として免疫することにより得られた抗体であるクレーム3記載の方法。
- 15 5. (a-1) 不溶性担体に固定化されたヒトタウ蛋白に対する抗体、
(a-2) 標識物質により標識化したヒトタウ蛋白に対する抗体、
(b) 溶解剤、
(c) 洗浄剤および
(d) 標識物質が酵素である場合には、酵素活性を測定するため
20 の基質および反応停止剤、
を組合せたヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の免疫学的測定キットであって、前記(a-1)および(a-2)の抗体は、
いずれもヒトタウ蛋白の第251番目～第441番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有していることを特徴とするキット。
- 25 6. 前記(a-1)および(a-2)の抗体は、いずれもポリクロナール抗体であるクレーム5記載のキット。
7. 該ポリクロナール抗体は、ヒト脳から分離された可溶性ヒトタウ蛋白を免疫原として免疫することにより得られた抗体であるクレーム6記載のキット。

- 8.(i) ヒトからヒト脳脊髄液を準備し、
(ii) 不溶性担体固定化抗体および標識化抗体であり且ついずれの抗体もヒトタウ蛋白の第251番目～第441番目のアミノ酸配列領域に認識部位を有している抗体を準備し、
5 (iii) 前記(i)のヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白を前記(ii)の2種の抗体を使用して免疫学的に測定し、
(iv) その測定した値より、ヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白の量を決定し、そして
(v) その量よりそのヒトの中枢神経細胞障害の病症を診断する、
10 ことを特徴とするヒトの中枢神経細胞障害の病症の診断方法。
9. 中枢神経細胞障害がアルツハイマー病 (Alzheimer's disease) であるクレーム8記載の診断方法。
10. ヒト脳脊髄液中の可溶性ヒトタウ蛋白量が少なくとも0.5 ng / ml の濃度で含有されることによって、健常人と区別してアルツハイマー病を診断するクレーム9記載の診断方法。
15 11. 該不溶性担体固定化抗体および標識化抗体はいずれもポリクローナル抗体であるクレーム8記載の診断方法。
12. 該ポリクローナル抗体は、ヒトの脳から分離された可能性ヒトタウ蛋白を免疫源として免疫することにより得られた抗体である
20 クレーム11記載の診断方法。

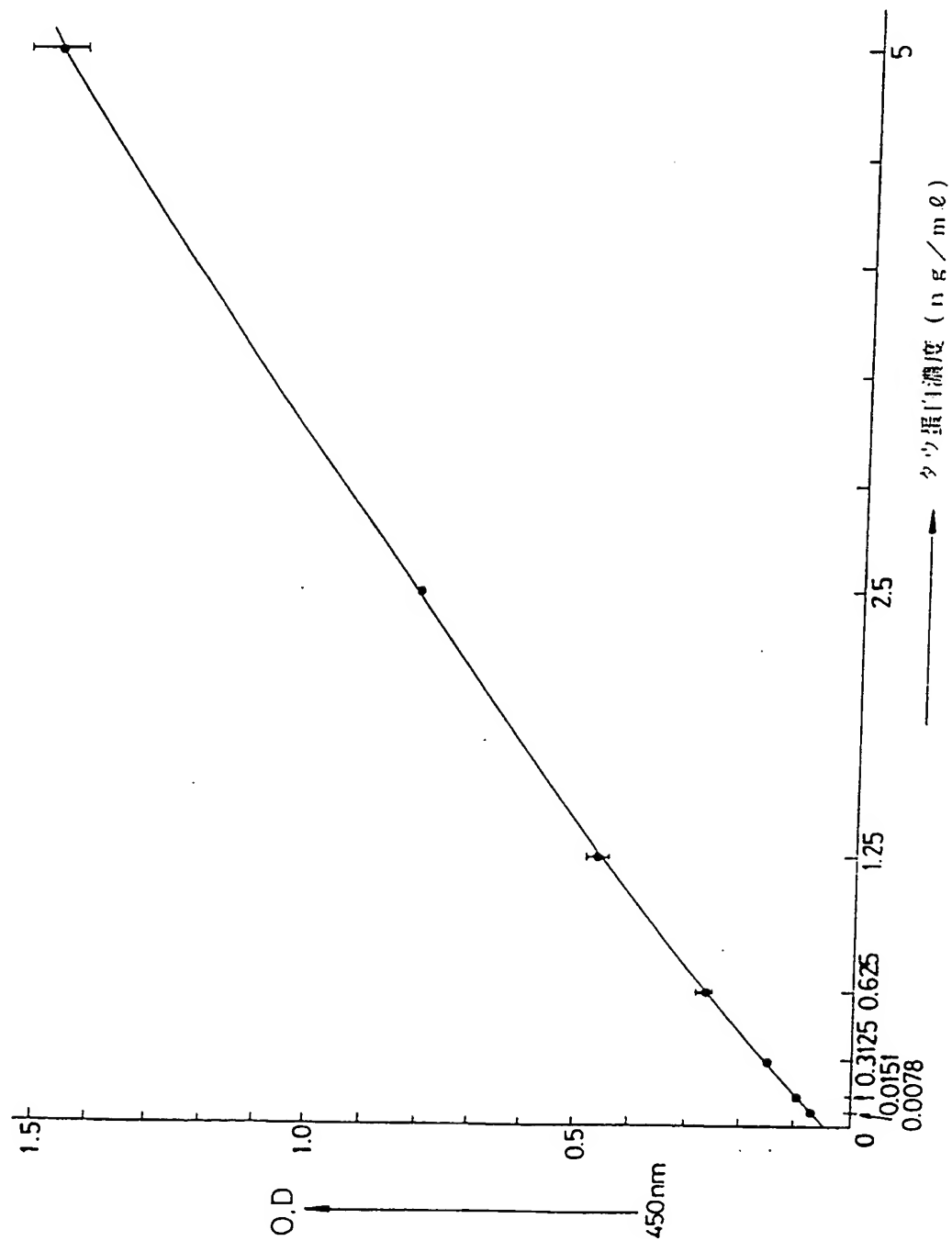
1 / 6

図 1



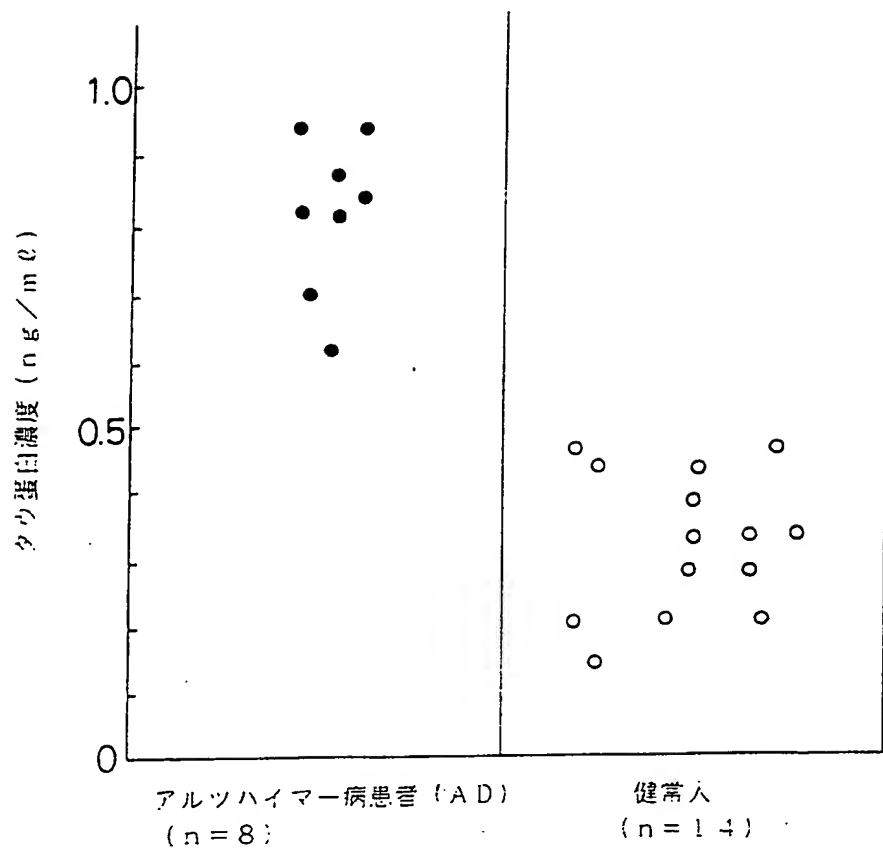
2 / 6

図 2



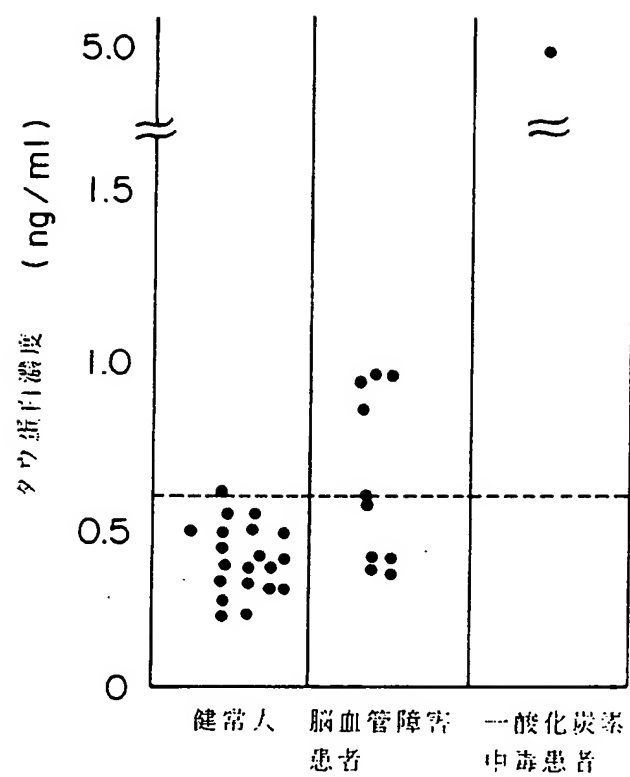
3/6

図 3



4/6

図 4



5 / 6

図 5

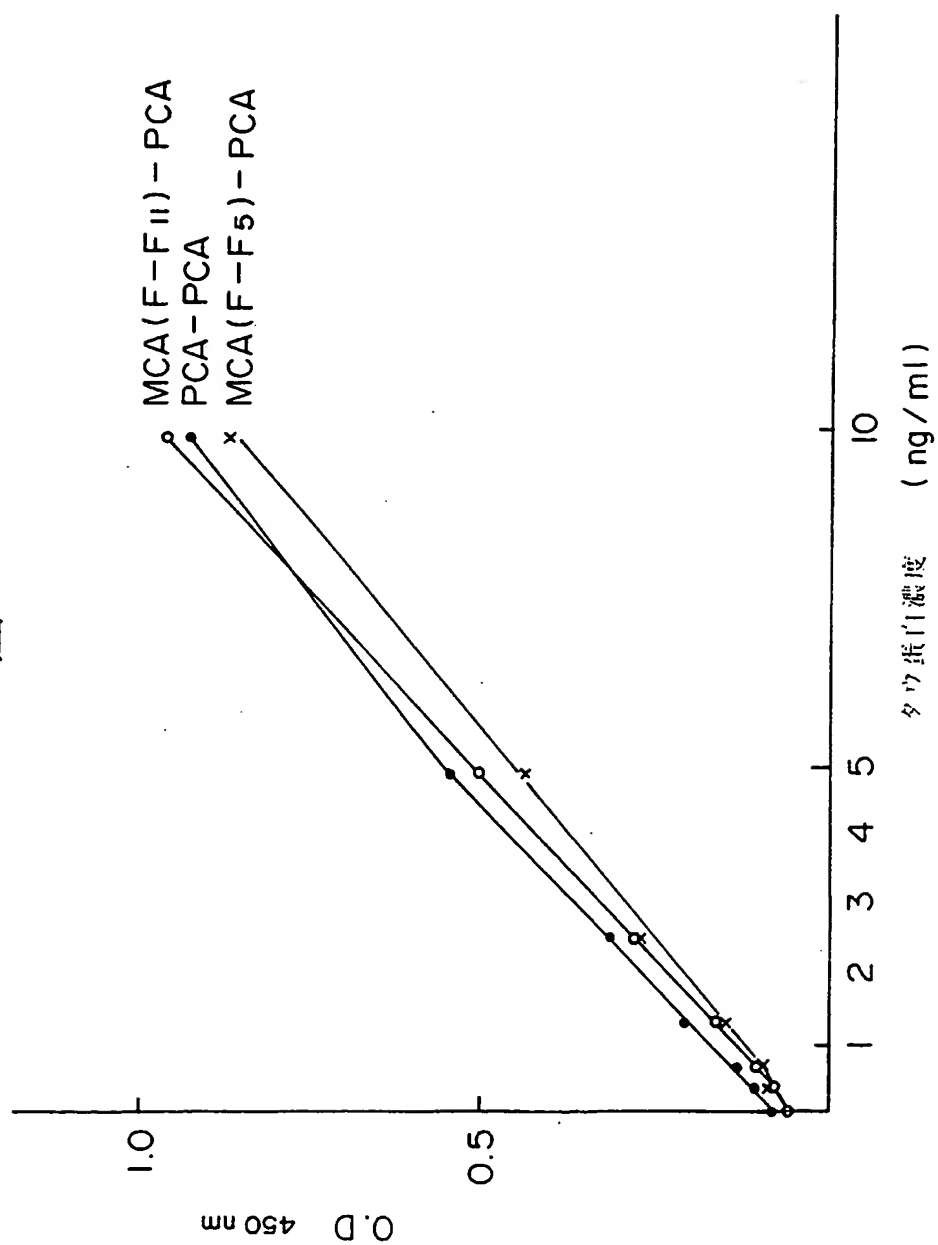
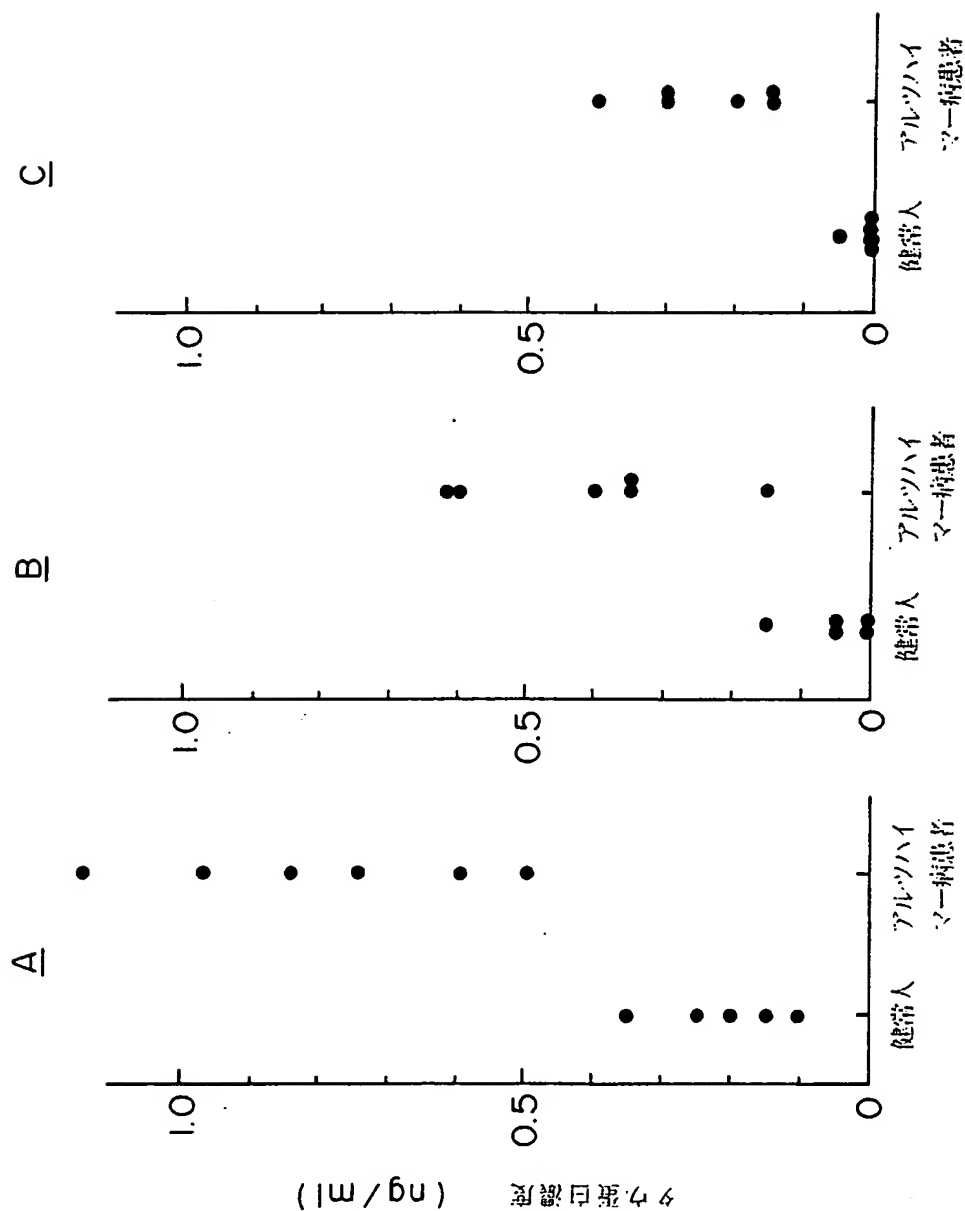


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00196

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁵ G01N33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|---|---|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁵ G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | Journal of Neuroscience, Vol. 10, No. 10, (1990) Ueda K et. al., "Alz-50 recognizes a phosphorylated epitope of tau protein" P. 3295-3304 | 1-7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 88, No. 13, (1991) Novak M. et. al., "Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7. 51" P. 5837-5841 | 1-7 |
| Y | Biochemical Journal, Vol. 273, No. 1, (1991) Brion J-P et. al., "Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles amino and carboxyl-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site" P. 127-134 | 1-7 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search April 20, 1994 (20. 04. 94) | | Date of mailing of the international search report May 24, 1994 (24. 05. 94) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No. | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00196

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | Acta Neuropathologica, Vol. 80, No. 2, (1990) Delacourte A. et. al., "Pathological proteins tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease demonstration with a panel of antigodies against tau proteins" P. 111-117 | 1-7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 89, No. 12, (1992) Lichtenberg-Kraag B. et. al., "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau" P. 5384-5388 | 1-7 |
| P, Y | Brain Research, Vol. 629, No. 1, (1993) Kenessey A. et. al., "The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments" P. 40-46 | 1-7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Vol. 86, No. 14, (1989) Iqbal K. et. al., "Identification and paired helical filaments of Alzheimer disease" P. 5646-5650 | 1-7 |
| Y | Neuroscience, Vol. 37, No. 1, (1990) Nieto A. et. al., "Characterization of tau protein present in microtubules and paired helical filaments of Alzheimer's disease patient's brain" P. 163-170 | 1-7 |
| Y | Alzheimer Disease and Associated Disorders, Vol. 6, No. 4, (1992) Caputo C. B. et. al., "Immunoreactivity of an antibody to a beta-A4 sequence with Alzheimer paired helical filaments and tau protein" P. 225-235 | 1-7 |
| P, Y | Journal of Biological Chemistry, Vol. 268, No. 13, (1993) Poulter L. et. al., "Locations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and a PHF-tau fragment" P. 9636-9644 | 1-7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 88, No. 13, (1991) Harrington C. R. et. al., "Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease" P. 5842-5846 | 1-7 |
| Y | Journal of Immunological Methods, Vo. 134, No. 2, (1990) Harrington C. R. et. al., "Competitive ELISA for the measurement of tau | 1-7 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00196

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| | protein in Alzheimer's disease" P. 261-272 | |
| A | FR, A, 2678638 (Bayer Ag.), January 8, 1993 (08. 01. 93), Abstract, (Family: none) | 1-7 |
| A | US, A, 5134062 (Cornell Res. Found Inc.), July 28, 1992 (28. 07. 92), Abstract, (Family: none) | 1-7 |
| P, A | WO, A, 9308302 (Innogenetics Nv. Sa.), April 29, 1993 (29. 04. 93), Abstract & AU, A, 9228002 | 1-7 |
| P, A | WO, A, 9311231 (Max Planck Ges. Foerderung Wissenschaften), June 10, 1993 (10. 06. 93), Abstract & AU, A, 9332560 | 1-7 |
| Y | EP, A, 155224 (Chromagenics. Inc.), September 18, 1985 (18. 09. 85), Abstract, (Family: none) | 1-7 |
| Y | JP, A, 57-16355 (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.), January 27, 1982 (27. 01. 82), Claim & SE, A, 8102558 & AU, A, 6981181 & FR, A, 2481318 & GB, A, 2074727 & DE, A, 3115115 | 1-7 |

| | | |
|---|---|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁵ G 01 N 33 / 53 | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁵ G 01 N 33 / 53 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 日本国実用新案公報 1926—1994年 日本国公開実用新案公報 1971—1994年 | | |
| 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Journal of Neuroscience, vol. 10, no. 10, (1990) Ueda K et al., "Alz-50 recognizes a phosphorylated epitope of tau protein" p. 3295—3304 | 1—7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, no. 13, (1991) Novak M. et al. "Difference between the tau protein of Alzheimer paired | 1—7 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 | |
| 20.04.94 | 24.05.94 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 柏崎康司 印 | 2 J 8 3 1 0 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 | | 3251 |

C (続き). 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| | helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51 " p 5837-5841 | |
| Y | Biochemical Journal, vol. 273, no. 1, (1991) Brion J-P et al., "Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles amino and carboxyl-terminal regions are differentially associated associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site " p. 127-134 | 1-7 |
| Y | Acta Neuropathologica, vol. 80, no. 2, (1990) Delacourte A. et al., "Pathological proteins tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease demonstration with a panel of antigodies against tau proteins " p. 111-117 | 1-7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, no. 12, (1992) Lichtenberg-Kraag B. et al., "Phosphorylation-dependent epitopes of neurofilament antibodies on tau protein and relationship with Alzheimer tau " p. 5384-5388 | 1-7 |
| P, Y | Brain Research, vol. 629, no. 1, (1993) Kenessey A. et al., "The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments " p. 40-46 | 1-7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, vol. 86, no. 14, (1989) Iqbal K. et al., "Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease " p. 5646-5650 | 1-7 |
| Y | Neuroscience, vol. 37, no. 1, (1990) Nieto A. et al., "Characterization of tau protein present in microtubules and paired helical filaments of Alzheimer's disease patient's brain " p. 163-170 | 1-7 |
| Y | Alzheimer Disease and Associated Disorders, vol. 6, no. 4, (1992) Caputo C. B. et al., "Immunoreactivity of an antibody to a beta-A4 sequence with Alzheimer | 1-7 |

C (続き). 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| | paired helical filaments and tau protein " p. 225 —235 | |
| P, Y | Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 13, (1993) Poulter L. et al., "Locations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and a PHF-tau fragment " p. 9636—9644 | 1—7 |
| Y | Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, no. 13, (1991) Harrington C. R. et al., "Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease " p. 5842—5846 | 1—7 |
| Y | Journal of Immunological Methods, vol. 134, no.1, 2, (1990) Harrington C. R. et al., "Competitive ELISA for the measurement of tau protein in Alzheimer's disease " p. 261—272 | 1—7 |
| A | FR, A, 2678638 (Bayer Ag.), 8. 1月. 1993 (08. 01. 93), 抄録部分 (ファミリー無し) | 1—7 |
| A | US, A, 5134062 (Cornell Res. Found Inc.), 28. 7月. 1992 (28. 07. 92), 抄録部分 (ファミリー無し) | 1—7 |
| P, A | WO, A, 9308302 (Innogenetics Nv. Sa.), 29. 4月. 1993 (29. 04. 93), 抄録部分 & AU, A, 9228002 | 1—7 |
| P, A | WO, A, 9311231 (Max Planck Ges. Foerderung Wissenschaften), 10. 6月. 1993 (10. 06. 93), 抄録部分 & AU, A, 9332560 | 1—7 |
| Y | EP, A, 155224 (Chromagenics. Inc.), 18. 9月. 1985 (18. 09. 85), 抄録部分 (ファミリー無し) | 1—7 |
| Y | JP, A, 57—16355 (エフ・ホフマンロー・ロシュ・ウン ト・コンパニー・アクチエンゲゼルシャフト), 27. 1月. 1982 (27. 01. 82), 特許請求の範囲 & SE, A, 8102558 | 1—7 |

C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| | <p>&AU, A, 6981181&FR, A, 2481318 &GB, A, 2074727&DE, A, 3115115</p> | |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.